

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 2 月 9 日 (09.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/010777 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/0781 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/141285
- (22) 国际申请日: 2021 年 12 月 24 日 (24.12.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110891900.X 2021年8月4日 (04.08.2021) CN
- (71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。
- (72) 发明人: 刘庄(LIU, Zhuang); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 孙

乐乐(SUN, Lele); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。

- (74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路 188 号吴中万达广场 A 座苏州大学国家科技园 2303, Jiangsu 215000 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) **Title:** LYMPHOCYTE-BASED HOMOLOGOUS TARGETED ARTIFICIAL ANTIGEN-PRESENTING CELL, AND CONSTRUCTION THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞及其构建和应用

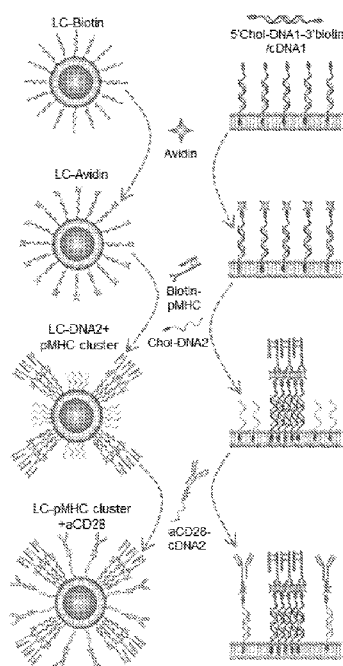


图 1

(57) **Abstract:** Provided is a lymphocyte-based homologous targeted artificial antigen-presenting cell, wherein the artificial antigen-presenting cell takes a lymphocyte as a carrier, and also comprises a complex that is coupled to the surface of the lymphocyte and is formed by a tumor antigen peptide and a major histocompatibility complex I, and a costimulatory molecule. The artificial antigen-presenting cell can be specifically migrated to a peripheral lymphoid organ in vivo, thereby activating antigen-specific CD8 positive T cells of the body itself, and thus has a potential application prospect in the preparation of a tumor immunotherapy drug.

(57) **摘要:** 提供了一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞, 所述人工抗原呈递细胞以淋巴细胞为载体, 还包括偶联在淋巴细胞表面的由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物、共刺激分子, 能够在体内特异性迁移到外周淋巴器官, 从而激活机体自身的抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞, 在制备肿瘤免疫治疗药物方面具有潜在的应用前景。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞及其构建和应用

技术领域

本发明涉及免疫治疗技术领域，尤其涉及一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞及其构建和应用。

背景技术

肿瘤是威胁人类生存的一种恶性疾病。随着世界人口的老龄化以及生活环境和生活习惯的变化，因肿瘤死亡的人数每年都在急剧增加。目前，化疗和放疗是临床上除手术切外进行肿瘤治疗的主要方法，但是其具有很强的毒副作用。癌症免疫治疗是近年来的研究热点。抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞活化在肿瘤免疫治疗中起重要作用。在此过程中，抗原呈递细胞 (APC) 通过 I 类主要组织相容性复合体 (MHC-I) 向 T 细胞呈递肿瘤特异性抗原是关键步骤。之前的研究表明，由树突状细胞 (DC) 等专职 APC 摄取的肿瘤抗原需要通过交叉呈递，才能以抗原肽-I 类主要组织相容性复合体 (pMHC-I) 的形式呈递到细胞表面。然而，自发抗原交叉呈递的效率是有限的，因此，已开发出 DC 细胞疫苗来激活患者体内肿瘤抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞。DC 细胞疫苗的制备，首先通过诱导自体干细胞分化获得 DC 细胞，然后通过人工干预增强体外肿瘤特异性抗原的交叉呈递。这是一个昂贵且劳动密集型的过程，且此类 DC 疫苗通过人工诱导交叉呈递，很难确保产品批次的稳定性。

人工抗原呈递细胞 (aAPC) 是天然 APC 的模拟物，用于体外 T 细胞扩增，在过继免疫疗法中发挥重要作用。aAPCs 是通过化学手段将 T 细胞激活配体，包括 pMHC (T 细胞受体激活配体) 和共刺激分子，修饰到生物相容性材料表面的来构建的。然而，之前报道的大多数 aAPCs 都是用人工合成的纳米或微米级颗粒作为基质材料构建的，这些 aAPCs 上的配体分布与天

然 APCs 上的配体分布有很大不同。Zhuang Liu 等 (DNA-Edited Ligand Positioning on Red Blood Cells to Enable Optimized T Cell Activation for Adoptive Immunotherapy. Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59, 14842–14853.) 使用脂质功能化 DNA 诱导的自组装技术, 利用红细胞 (RBC) 构建了 aAPC。

5 然而, 这些 aAPCs 都不能特异性迁移到有利于 T 细胞增殖的外周淋巴组织中的 T 细胞富集区域, 因此无法在活体内实现最佳的自体抗原特异性 T 细胞活化效果。

发明内容

为解决上述技术问题, 本发明提供了一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞, 能够在体内特异性迁移到外周淋巴器官, 从而激活机体自身的抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞, 进而杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长, 延长生存期。

10

本发明的一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞, 以淋巴细胞为载体, 还包括偶联在淋巴细胞表面的复合物和共刺激分子, 其中, 复合物由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成。

15

传统的基于合成材料的 aAPC 和基于 RBC 的 aAPC 都不能特异性迁移到外周淋巴组织中的 T 细胞富集区域, 这些区域是 T 细胞扩增的有利位置。本发明以淋巴细胞为载体构建的人工抗原呈递细胞, 可以通过淋巴细胞表面的归巢受体靶向迁移到外周淋巴器官, 包括脾脏和淋巴结, 从而与外周淋巴器官中的 T 细胞发生紧密接触, 进而有效激活机体自身的抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞。

20

进一步地, 基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞中, 淋巴细胞与复合物通过双链 DNA 连接, 其中, 淋巴细胞与双链 DNA 通过脂质连接, 复合物与双链 DNA 通过非共价作用结合;

25 淋巴细胞与共刺激分子通过完全互补的双链 DNA 连接, 其中, 淋巴细胞与双链 DNA 的一条链通过脂质连接, 共刺激分子与双链 DNA 的另一条链连接。

进一步地，复合物与双链 DNA 通过生物素和亲和素连接。DNA 和主要组织相容性复合体 I 的连接方式还可以是共价的，如 DNA 一端修饰巯基，通过常用小分子双功能交联剂（SMCC、sulfo-SMCC、SPDP 等）与蛋白表面氨基进行偶联。但是为了实现模拟天然 APC 表面主要组织相容性复合体的分布，在组装主要组织相容性复合体 I 时选用生物素-亲和素连接。如果利用 DNA 对主要组织相容性复合体 I 先进行共价修饰，再组装到细胞上，则无法模拟天然 APC 表面主要组织相容性复合体的分布。

进一步地，共刺激分子可与 DNA 的另一条链共价结合或非共价结合，优选地，共刺激分子与 DNA 的另一条链通过亲和素和生物素进行连接。

进一步地，淋巴细胞的表面分别修饰有单链 DNA1 和单链 DNA2，其中，单链 DNA1 由脂质和生物素双修饰且连接一个与其完全互补的单链 cDNA1，单链 DNA2 由脂质修饰且连接一个与其完全互补的单链 cDNA2，单链 cDNA2 由生物素修饰，复合物由生物素修饰，共刺激分子由生物素修饰；单链 DNA1 与复合物通过亲和素特异性结合；单链 cDNA2 与共刺激分子通过亲和素特异性结合。

现有技术中，采用一般化学偶联的方法将 T 细胞激活配体修饰在淋巴细胞表面会影响淋巴细胞表面受体蛋白的功能，尤其是归巢受体的功能。此外，在活细胞表面利用一般化学方法偶联 T 细胞激活配体也无法调控 T 细胞激活配体的分布，从而无法模拟天然抗原呈递细胞表面 T 细胞激活配体的分布形貌。本发明中，由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物以及共刺激分子通过 DNA、脂质、亲和素和生物素组装在淋巴细胞表面，其表面 T 细胞活化配体的分布形貌更加贴近于天然抗原呈递细胞，能够通过模拟天然 APCs 来精确控制 aAPCs 上活化配体的空间分布，从而实现 T 细胞活化的优化。

进一步地，脂质包括固醇类和磷脂，如胆固醇、鞘磷脂、神经节苷脂或长链烷烃等。

进一步地，生物素为可与氨基反应的生物素，如 N-羟基琥珀酰亚胺生

物素(主要组织相容性复合体 I 和共刺激分子上的氨基与 N-羟基琥珀酰亚胺生物素上的 N-羟基琥珀酰亚胺形成共价键)或羧基功能化的生物素(利用 EDC 介导主要组织相容性复合体 I 和共刺激分子上的氨基和羧基偶联)。

进一步地,单链 DNA1 中,脂质修饰在 DNA1 的 5'端,生物素修饰在 DNA1 的 3'端;单链 cDNA2 中,生物素修饰在 cDNA2 的 5'端;单链 DNA2 中,脂质修饰在 DNA2 的 5'端。

进一步地,淋巴细胞来源于自身外周血。外周血淋巴细胞主要包括 T 细胞和 B 细胞,取自身外周血目的是减轻排异反应。

进一步地,共刺激分子选自 CD28 抗体、CD40 抗体、OX40 抗体、CD27 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体中的一种或几种,优选为 CD28 抗体。

进一步地,肿瘤抗原肽选自肿瘤相关的抗原的肽、自身抗原的肽、同种异型抗原的肽和传染剂抗原的肽中的一种或几种,如 OVA₂₅₇₋₂₆₄, Mc38 肿瘤抗原肽。

进一步地,单链 DNA2 和单链 DNA1 的序列长度为 15-60 碱基,优选为 20-30 碱基,保证 DNA 杂交的稳定性。

本发明要求保护上述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞在制备肿瘤免疫治疗药物中的应用。

进一步地,当上述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞应用在制备肿瘤免疫治疗药物中时,肿瘤抗原肽为从肿瘤中筛选出的抗原肽或同类型肿瘤中普遍存在的抗原肽。

本发明的一种肿瘤治疗制剂,包括上述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞。

进一步地,肿瘤治疗制剂还包括 PD1 抗体。

进一步地,肿瘤治疗分多次进行,多次免疫可激发更强的免疫反应。

进一步地,上述肿瘤治疗制剂的给药方式为静脉注射。

进一步地，上述肿瘤治疗制剂可用于治疗结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、头颈部肿瘤、胃癌、膀胱癌、骨癌、喉癌、肝癌、胰腺癌或鼻咽癌。

本发明上述人工抗原呈递细胞的构建方法，包括以下步骤：

(1) 将主要组织相容性复合体 I 与生物素在缓冲液中反应，得到生物素修饰的主要组织相容性复合体 I，将其与肿瘤抗原肽孵育结合，得到由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物；

将共刺激分子与生物素在缓冲液中反应，得到生物素修饰的共刺激分子，将其与亲和素孵育结合，得到亲和素修饰的共刺激分子，将其与生物素修饰的单链 cDNA2 孵育结合，得到 cDNA2 修饰的共刺激分子；

将淋巴细胞与脂质和生物素双修饰的单链 DNA1、cDNA1 在缓冲液中孵育结合，得到 DNA 修饰的淋巴细胞，将 DNA 修饰的淋巴细胞与亲和素在缓冲液中孵育结合，得到亲和素修饰的淋巴细胞；

(2) 将亲和素修饰的淋巴细胞、由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物、脂质修饰的单链 DNA2 在缓冲液中孵育结合，得到复合物和 DNA2 双修饰的淋巴细胞；

(3) 将复合物和 DNA2 双修饰的淋巴细胞与 cDNA2 修饰的共刺激分子在缓冲液中孵育结合，得到基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞。构建流程示意图如图 1 所示。

进一步地，在步骤 (1) 中，主要组织相容性复合体 I 与生物素的摩尔比为 1: 20-40，优选为 1: 20。

进一步地，在步骤 (1) 中，共刺激分子与生物素的摩尔比为 1: 10-20。优选为 1: 10。

进一步地，在步骤 (1) 中，生物素修饰的共刺激分子与亲和素的摩尔比为 1: 3-5，优选为 1: 3。

进一步地，在步骤 (1) 中，亲和素修饰的共刺激分子与生物素修饰的单链 cDNA2 的摩尔比为 1: 6-10，优选为 1: 6。

进一步地,在步骤(1)中,淋巴细胞与脂质和生物素双修饰的单链 DNA1 的摩尔比为 $1: 1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$, 优选为 $1: 1 \times 10^7$ 。

进一步地,在步骤(1)中,淋巴细胞与 cDNA1 的摩尔比为 $1: 2 \times 10^7 - 6 \times 10^7$, 优选为 $1: 2 \times 10^7$ 。

5 进一步地,在步骤(1)中,DNA 修饰的淋巴细胞与亲和素的摩尔比为 $1: 5 \times 10^7 - 1.5 \times 10^8$, 优选为 $1: 5 \times 10^7$ 。

进一步地,在步骤(2)中,亲和素修饰的淋巴细胞、由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物、脂质修饰的单链 DNA2 的摩尔比为 $1: 1 \times 10^4 - 5 \times 10^6: 5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 。优选为 $1: 1 \times 10^4: 5 \times 10^6$ 。

10 进一步地,在步骤(3)中,复合物和 DNA2 双修饰的淋巴细胞、cDNA2 修饰的共刺激分子的摩尔比为 $1: 1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 。

本发明的 DNA 工程化的基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞制备过程中,通过主要组织相容性复合体 I 和共刺激分子上的氨基与生物素形成共价键对主要组织相容性复合体 I 和共刺激分子进行生物素修饰。通过
15 脂质和细胞膜的自发结合,对淋巴细胞进行 DNA 修饰。通过亲和素-生物素特异性结合对共刺激分子进行 DNA 修饰。共刺激分子通过 DNA 特异性杂交偶联到淋巴细胞表面。由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物通过亲和素-生物素特异性结合偶联到淋巴细胞表面,并由于多重亲和素-生物素特异性结合而发生聚集,从而模拟天然抗原呈递细胞表面主要组
20 织相容性复合体 I 的分布形貌。

借由上述方案,本发明至少具有以下优点:

(1) 本发明提供了一种基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞,其可以在活体内靶向迁移到外周淋巴器官,与外周淋巴器官中的 T 细胞紧密接触,从而更有利于抗原特异性 T 细胞活化。

25 (2) 本发明的基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞,相较于基于天然抗原呈递细胞的疫苗技术,更易控制其表面 T 细胞激活配体的数量,

从而制备出批次间质量稳定的产品。此外，相较于基于天然抗原呈递细胞的疫苗技术，本发明无需细胞培养和诱导抗原交叉等过程，因此成本更低，同时可以在更短的时间内对病人施加治疗。

上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合详细附图说明如后。

附图说明

为了使本发明的内容更容易被清楚的理解，下面根据本发明的具体实施例并结合附图，对本发明作进一步详细的说明。

10 图 1 为本发明基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞的构建流程示意图；

图 2 为实施例 1 在淋巴细胞表面组装 pMHC-I 和 CD28 抗体激光共聚焦扫描显微镜成像图；

15 图 3 为实施例 2 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于体外抗原特异性 T 细胞扩增的结果图；

图 4 为实施例 3 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于活体外周淋巴器官靶向结果图；

图 5 为实施例 4 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于在活体刺激外源性抗原特异性 T 细胞活化的结果图；

20 图 6 为实施例 5 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于在活体刺激内源性抗原特异性 T 细胞活化的结果图；

图 7 为实施例 6 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合免疫检查点抑制剂用于小鼠 B16-OVA 黑色素瘤模型个性化免疫治疗结果图；

25 图 8 为实施例 7 中基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合免疫检查点抑制剂用于小鼠 Mc38 结肠癌皮下瘤模型化疗增敏中治愈小鼠的免疫记忆功能评价结果图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

实施例 1

一种用于小鼠 B16-OVA 肿瘤模型治疗的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞的制备和表征

(1)将 20 倍过量的 N-羟基琥珀酰亚胺 atto488 和 N-羟基琥珀酰亚胺生物素依次加入 50 μ L 0.5 mg/mL 主要组织相容性复合体 I (MHC-I) 中。

在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时后,用 100 KDa 超滤管通过两次超滤去除过量的 atto488 和生物素。然后通过 BCA 定量试剂盒检测修饰后的 MHC-I 的浓度。一个 MHC-I 上 atto488 的平均数量是通过紫外-可见吸收来检测的。估计一个 MHC-I 上生物素的平均数量与 atto488 相同。为了制备抗原肽和 MHC-I 形成的复合物 (pMHC-I),将生物素和 atto488 标记的 MHC-I 与 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 8 小时。然后,用 100 KDa 超滤管通过两次超滤去除多余的肽。pMHC-I 的浓度是通过 BCA 蛋白定量试剂盒来测量的。

(2)将 10 倍过量的 N-羟基琥珀酰亚胺 alexa647 和 N-羟基琥珀酰亚胺生物素加入 50 μ L 1 mg/mL CD28 抗体 (aCD28)。修饰后 aCD28 的纯化按照与上述纯化修饰后 pMHC-I 相同的方法进行。通过 BCA 测定修饰后的 aCD28 的浓度。通过紫外-可见吸收检测一个 aCD28 上 alexa647 的平均数量。估计一个 CD28 抗体上生物素的平均数量与 alexa647 相同。为了将 DNA 连接到 aCD28 上,首先将 aCD28-alexa647-生物素与 4 倍过量的亲和素在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。之后,将生物素标记的 DNA2 (5'biotin-cDNA2) 加入与抗生物素蛋白等摩尔量的抗体溶液中,然后孵育 30 分钟。

(3)使用毛细管从小鼠眼眶收集外周血,使用小鼠外周血白细胞分离试剂盒,按照厂商说明书进行密度梯度离心,获得淋巴细胞。细胞计数仪计数后,淋巴细胞 (1×10^7) 首先与 5'胆固醇和 3'生物素修饰的 DNA1

(5'-chol-DNA1-3'-生物素) (2 μ L, 100 μ M) 和 cDNA1 (DNA1 与 cDNA1 的摩尔比 1:2) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。通过离心去除多余的 DNA 后, 将淋巴细胞重新悬浮在 PBS 中并进行计数。

(4) 将细胞与 5 倍过量的亲和素在 4℃ 下孵育 30 分钟。通过两次离心 (1300 rpm 3 min) 去除过量的亲和素后, 将淋巴细胞重悬于 PBS 中并通过细胞计数器计数。

(5) 将亲和素标记的淋巴细胞与 atto488 和生物素标记的 pMHC-I 以及 5'chol-DNA2 分别以 $1:5 \times 10^5$ 和 $1:5 \times 10^6$ 的摩尔比混合, 4°C 孵育 30 分钟后, 加入过量的生物素封闭亲和素上未结合的位点。随后, 通过离心 (1300 rpm 3 min) 去除多余的 pMHC-I 和 5'chol-DNA2。

(6)将淋巴细胞重悬于PBS缓冲液中,与 5'biotin-cDNA2 修饰的 aCD28 按照摩尔比 $1:5 \times 10^5$ 进行混合,4℃孵育 1 小时。过量的 aCD28 通过两次离心 (1300 rpm 3min) 去除。

(7) 利用激光共聚焦扫描显微镜成像证明淋巴细胞表面是否成功偶联了 pMHC-I 和 aCD28, 并观察 pMHC-I 的分布。

其中, DNA1、cDNA1、DNA2 和 cDNA2 的序列信息如表 1 所示。

表 1 序列信息

[illegible]

结果如图 2 所示,激光共聚焦扫描显微镜对基于淋巴细胞的同源靶向性
20 人工抗原呈递细胞的成像结果显示 pMHC-I 和 aCD28 成功偶联到了淋巴细

胞表面，且 pMHC-I 的分布呈聚集状态，模拟了天然抗原呈递细胞表面 pMHC-I 的分布状态。

实施例 2

一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于体外抗原特异性 T 细胞扩增

(1) 处死一只转基因的 OT-I 小鼠，然后取出脾放入培养皿中并加入预冷的 PBS。用注射器柄将脾脏磨碎，然后将组织破碎液收集到离心管中，以 1300rpm 离心，收集沉淀，加入 3 mL 红细胞裂解液。3 min 之后，加入 3 mL PBS 终止裂解。离心后，用 PBS 重悬，通过 400 目无菌纱布进行过滤。离心后获得脾细胞（1300 rpm 3）重悬于 2 mL PBS，并用细胞计数器进行计数。将 2×10^7 个脾细胞悬浮在 10 mL 含有 1 μ L 8 mM CFSE 的 PBS 中。然后将细胞悬液在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 15 分钟。随后通过离心（1300 rpm 5min）收集 CFSE 染色的细胞并重悬 1640 培养基中。

(2) 将 2×10^5 CFSE 染色的 OT-I 小鼠脾细胞悬浮于 250 μ L 1640 培养基中，与实施例 1 所述步骤构建的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞在圆底 96 孔板中以 1:1 的细胞比例孵育。作为对照，将 2×10^5 CFSE 染色的 OT-I 小鼠脾细胞悬浮于 250 μ L 1640 培养基中，分别与游离的 pMHC-I 和 aCD28，仅偶联了 pMHC-I 的淋巴细胞，以及仅偶联了 aCD28 的淋巴细胞进行孵育培养。孵育 3 天后，离心收集细胞（1300 rpm 3min），上清液保存于 -20 $^{\circ}$ C 用于细胞因子检测。根据供应商的说明手册，使用 ELISA 试剂盒检测 IFN γ 和 TNF α 。

(3) 通过流式细胞术检测 CD8 阳性 T 细胞增殖。将脾细胞重新悬浮在缓冲液中，并用 PE 标记的 CD3 抗体、Percp 标记的 CD8 抗体标记 CD8 阳性 T 细胞。PE 和 Percp 双阳性细胞被门控为 CD8+ T 细胞。通过 CFSE 荧光稀释程度来分析细胞增殖。

结果如图 3 所示（A 为流式结果图，B 为流式结果统计图，C 为培养上清细胞因子浓度测试结果统计图），可见基于淋巴细胞同源靶向性人工抗

原呈递细胞可以高效的刺激抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞。

实施例 3

基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞用于活体外周淋巴器官
靶向

5 (1) 按照实施例 1 所述步骤制备的基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞, 利用细胞膜染料 DID ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 644/663 \text{ nm}$) 进行染色。

(2) 以每只 1×10^7 个的数量通过尾静脉注射到小鼠体内。3 天后处死小鼠, 取脾脏和淋巴结制备细胞悬液。然后, 将细胞用 FITC 标记的 CD3 抗体 (aCD3-FITC) 和 PE 标记的 CD19 抗体 (aCD19-PE) 染色, 用于
10 流式细胞仪分析。

结果如图 4 所示 (A-B 为流式结果显示基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞在脾脏中富集, C 对应于 A-B 的统计结果, D-E 为流式结果显示基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞在淋巴结中富集, F 对应于 D-E 的统计结果), 表明 DNA 工程化的基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞可以有效地迁移到外周淋巴器官, 包括脾脏和淋巴结。
15

实施例 4

基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞用于在活体刺激外源性抗原特异性 T 细胞活化

(1) 2×10^7 个 CFSE 染色的 OT-I 小鼠的脾细胞通过尾静脉注射到 C57
20 小鼠体内, 一天后, 将 5×10^6 个按照实施例 1 制备的 DNA 工程化的基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞也通过尾静脉注射到小鼠体内, 以游离的 pMHC-I 和 aCD28 作为对照。

(2) 6 天后取 C57 小鼠脾脏和淋巴结, 制备脾细胞和淋巴结细胞悬液。然后用 PE 标记的 CD3 抗体和 Percp 标记的 CD8 抗体对 2×10^6 个脾细胞或淋巴结细胞悬液进行染色。然后在除去过量抗体后通过流式细胞术分析。PE
25 阳性细胞群被划为 T 细胞, Percp 和 CFSE 双阳性细胞用于检测 CFSE 稀

释程度。

结果如图 5 (A 为不同处理下脾脏中外源性抗原特异性 T 细胞增殖流式结果图, B 对应于图 A 结果的统计结果, C 为不同处理下淋巴结中外源性抗原特异性 T 细胞增殖流式结果图, D 对应于图 C 结果的统计结果), 相比
5 对照组, 基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞可以有效地刺激 OT-I 小鼠来源的抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞的活化。

实施例 5

基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞用于在活体刺激内源性抗原特异性 T 细胞活化

10 (1) 将 5×10^6 个按照实施例 1 制备的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞通过尾静脉直接注射到 C57 小鼠中。

(2) 3 天后取 C57 小鼠脾脏制备脾细胞。CFSE 染色后, 2×10^5 个脾细胞重悬于 250 μ L 1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养于圆底 96 孔板中。然后加入或不加入 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽 (1 μ g/孔)。培养 3 天后, 收集细胞, 用 PE 标记的 CD3
15 抗体和 Percp 标记的 CD8 抗体对 CD8 阳性 T 细胞进行标记。然后在除去过量抗体后通过流式细胞术分析

结果如图 6 显示 (A 为未注射人工抗原呈递细胞的小鼠脾脏细胞加与不加抗原肽刺激后 CD8 阳性 T 细胞增殖流式结果图, B 为注射人工抗原呈递细胞的小鼠脾脏细胞加与不加抗原肽刺激后 CD8 阳性 T 细胞增殖流式结果
20 图, C 对应于图 A 和 B 的统计结果图), 相比对照组, 基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞可以有效地内源性抗原特异性 CD8 阳性 T 细胞的活化。

实施例 6

基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合免疫检查点抑制剂
25 用于小鼠 B16-OVA 黑色素瘤模型个性化免疫治疗

通过在雌性 C57 小鼠的背部皮下注射 1×10^6 (悬浮于 50 μ L PBS 中) 个

B16-OVA 细胞来接种小鼠 B16-OVA 黑色素瘤模型。接种肿瘤 10 天后，将小鼠分为 4 组进行治疗：1. 不治疗； 2. PD1 抗体治疗； 3. 按照实施例 1 制备的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞治疗； 4. 按照实施例 1 制备的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合 PD1 抗体治疗。

5 人工抗原呈递细胞的第一次输入在肿瘤接种后第 10 天进行，第二次输入在第 16 天进行。在第 12 天、第 15 天和第 18 天，以每只小鼠 15 μ g 的剂量静脉注射 PD1 抗体。期间密切监测不同组小鼠的肿瘤体积和存活率。

结果如图 7（A 为治疗流程图，B 为不同处理组小鼠肿瘤生长曲线，C 为不同处理组小鼠生存曲线），按照实施例 1 制备的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合 PD1 抗体治疗可以有效抑制肿瘤生长，延长小鼠生存期。

实施例 7

基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合免疫检查点抑制剂用于小鼠 Mc38 模型免疫治疗

15 （1）基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞的制备按照实施例 1 所述步骤进行，只是将 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽替换为 Mc38 新抗原肽，序列为 SIIVFNLL（从氮末端到碳末端）。

（2）通过在雌性 C57 小鼠的背部皮下注射 1 $\times$ 10⁶（悬浮于 50 μ L PBS 中）个 Mc38 肿瘤细胞来接种小鼠 Mc38 结肠癌模型。接种肿瘤 5 天后，将小鼠分为 4 组进行治疗：1. 不治疗； 2. PD1 抗体治疗； 3. DNA 工程化的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞治疗； 4. DNA 工程化的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞联合 PD1 抗体治疗。人工抗原呈递细胞的第一次回输在肿瘤接种后第 5 天进行，第二次回输在第 11 天进行。在第 7 天、第 10 天和第 13 天，以每只小鼠 15 μ g 的剂量静脉注射 PD1 抗体。

25 期间密切监测不同组小鼠的肿瘤体积和存活率。

结果如图 8（A 为治疗流程图，B 为不同处理组小鼠肿瘤生长曲线，C 为不同处理组小鼠生存曲线），可见基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈

递细胞联合 PD1 抗体治疗可以有效抑制肿瘤生长，延长小鼠生存期。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而
5 由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

序列表

<110> 苏州大学

<120> 基于淋巴细胞的同源靶向性人工抗原呈递细胞及其构建和应用

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 1

agagagagag agagagagag agagagagag 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 2

ctctctctct ctctctctct ctctctctct 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> (人工序列)

<400> 3

atcgcttagg atacctgcat cgttattgca 30

<210> 4

<211> 30
<212> DNA
<213> (人工序列)

<400> 4
tgcaataacg atgcaggtat cctaagcgat

权 利 要 求 书

1. 一种基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞，其特征在于，所述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞以淋巴细胞为载体，还包括偶联在所述淋巴细胞表面的复合物和共刺激分子，其中，所述复合物由肿瘤
5 抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成。

2. 根据权利要求 1 所述的人工抗原呈递细胞，其特征在于：

所述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞中，所述淋巴细胞与
所述复合物通过双链 DNA 连接，其中，所述淋巴细胞与所述双链 DNA 通过
脂质连接，所述复合物与所述双链 DNA 通过非共价作用结合；

10 所述淋巴细胞与所述共刺激分子通过完全互补的双链 DNA 连接，其中，
所述淋巴细胞与所述双链 DNA 的一条链通过脂质连接，所述共刺激分子与
所述双链 DNA 的另一条链连接。

3. 根据权利要求 1 所述的人工抗原呈递细胞，其特征在于：

所述淋巴细胞的表面分别修饰有单链 DNA1 和单链 DNA2，其中，所述
15 单链 DNA1 由脂质和生物素双修饰且连接一个与其完全互补的单链 cDNA1，
所述单链 DNA2 由脂质修饰且连接一个与其完全互补的单链 cDNA2，单链
cDNA2 由生物素修饰，所述复合物由生物素修饰，所述共刺激分子由生物
素修饰；

所述单链 DNA1 与所述复合物通过亲和素特异性结合；

20 所述单链 cDNA2 与所述共刺激分子通过亲和素特异性结合。

4. 根据权利要求 1 所述的人工抗原呈递细胞，其特征在于：所述淋巴细胞
来源于自身外周血。

5. 根据权利要求 1 所述的人工抗原呈递细胞，其特征在于：所述共刺激
分子选自 CD28 抗体、CD40 抗体、OX40 抗体、CD27 抗体、CD137 抗体和
25 GITR 抗体中的一种或几种。

6. 根据权利要求 1 所述的人工抗原呈递细胞, 其特征在于: 所述肿瘤抗原肽选自肿瘤相关的抗原的肽、自身抗原的肽、同种异型抗原的肽和传染剂抗原的肽中的一种或几种。

7. 一种权利要求 1-6 任一项所述的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞在制备肿瘤免疫治疗药物中的应用。

8. 一种肿瘤治疗制剂, 其特征在于: 所述肿瘤治疗制剂包括权利要求 1-6 任一项所述的基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞。

9. 根据权利要求 8 所述的肿瘤治疗制剂, 其特征在于: 所述肿瘤治疗制剂还包括 PD1 抗体。

10. 权利要求 3 所述的人工抗原呈递细胞的构建方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 将主要组织相容性复合体 I 与生物素在缓冲液中反应, 得到生物素修饰的主要组织相容性复合体 I, 将其与肿瘤抗原肽孵育结合, 得到由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物;

15 将共刺激分子与生物素在缓冲液中反应, 得到生物素修饰的共刺激分子, 将其与亲和素孵育结合, 得到亲和素修饰的共刺激分子, 将其与生物素修饰的单链 cDNA2 孵育结合, 得到 cDNA2 修饰的共刺激分子;

20 将淋巴细胞与脂质和生物素双修饰的单链 DNA1、cDNA1 在缓冲液中孵育结合, 得到 DNA 修饰的淋巴细胞, 将 DNA 修饰的淋巴细胞与亲和素在缓冲液中孵育结合, 得到亲和素修饰的淋巴细胞;

(2) 将所述亲和素修饰的淋巴细胞、所述由肿瘤抗原肽和主要组织相容性复合体 I 形成的复合物、脂质修饰的单链 DNA2 在缓冲液中孵育结合, 得到复合物和 DNA2 双修饰的淋巴细胞;

25 (3) 将所述复合物和 DNA2 双修饰的淋巴细胞与所述 cDNA2 修饰的共刺激分子在缓冲液中孵育结合, 得到所述基于淋巴细胞同源靶向性人工抗原呈递细胞。

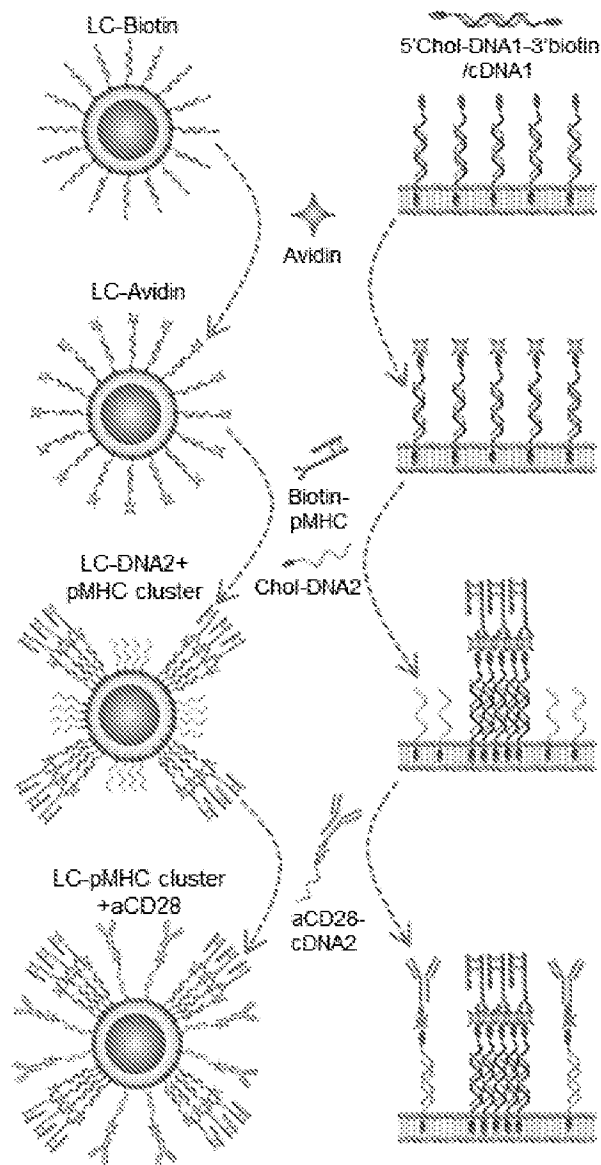


图 1

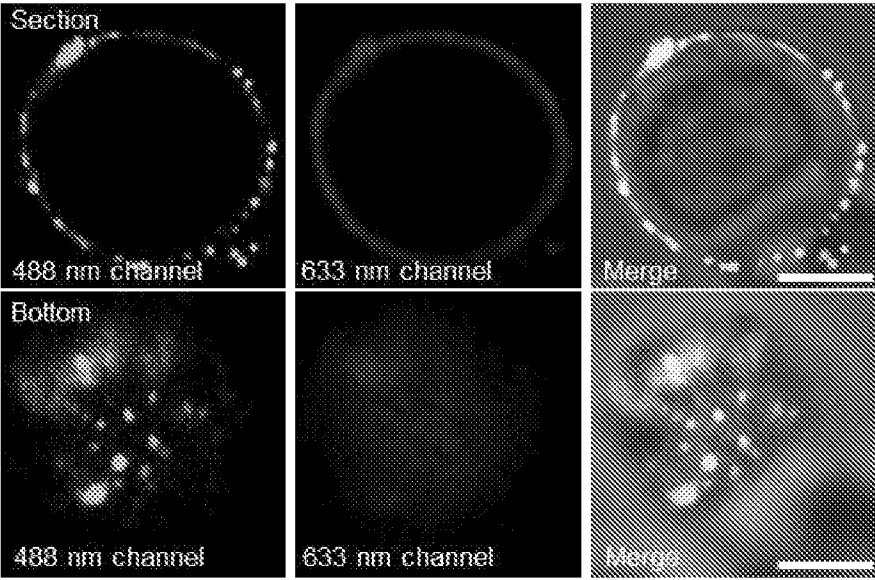


图 2

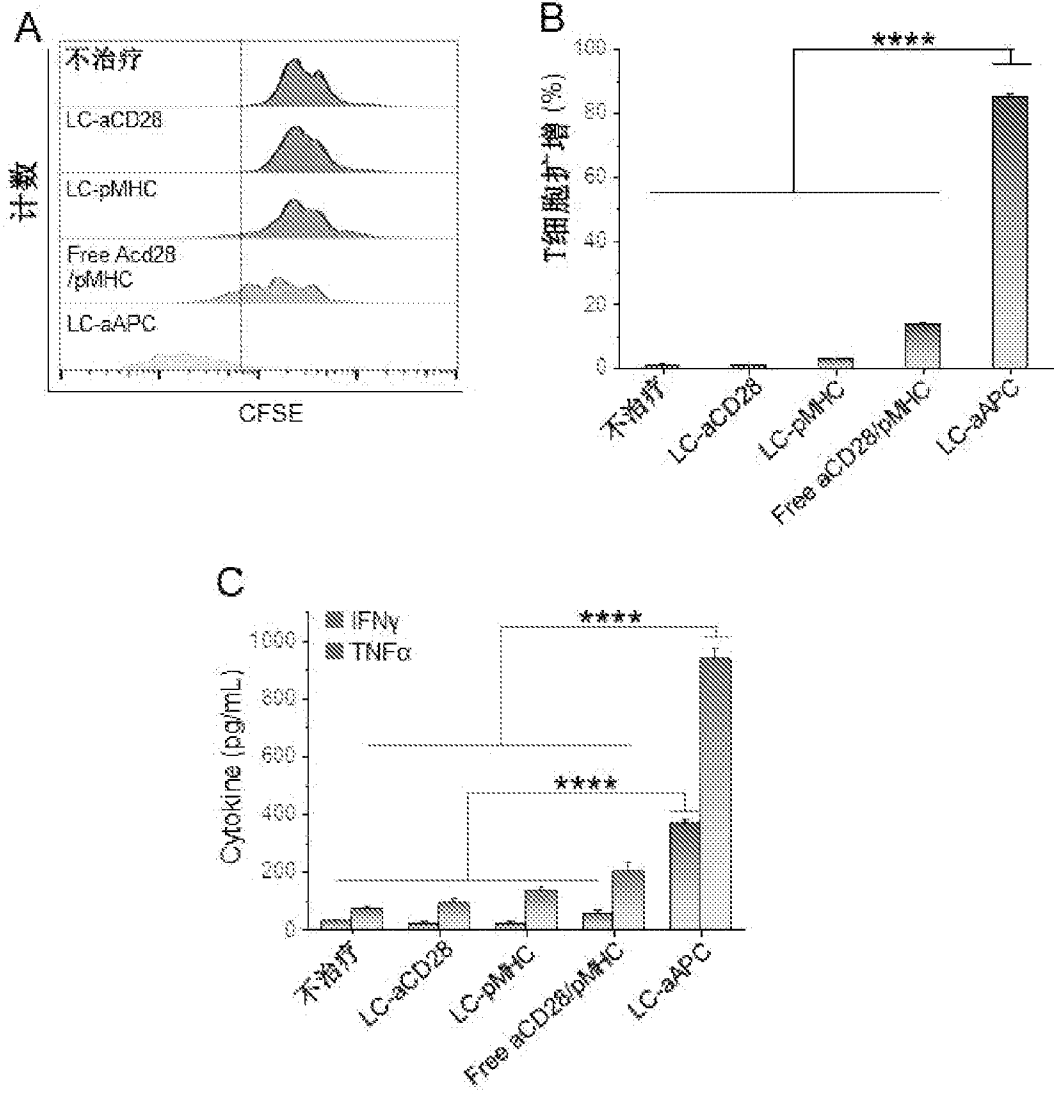


图 3

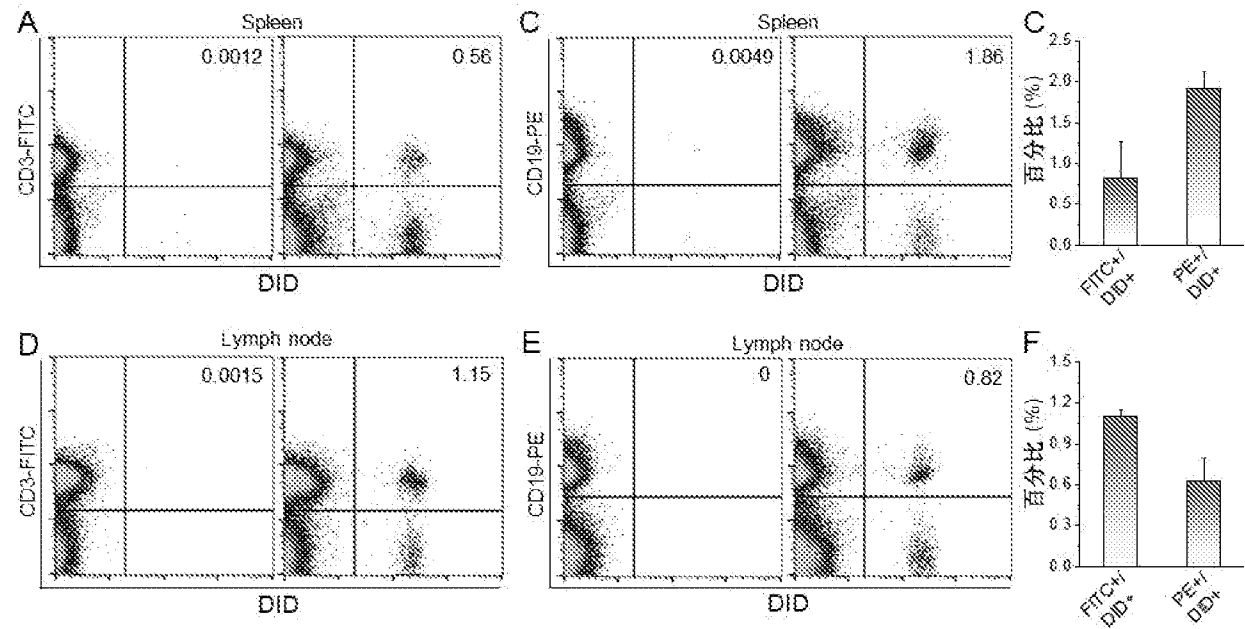


图 4

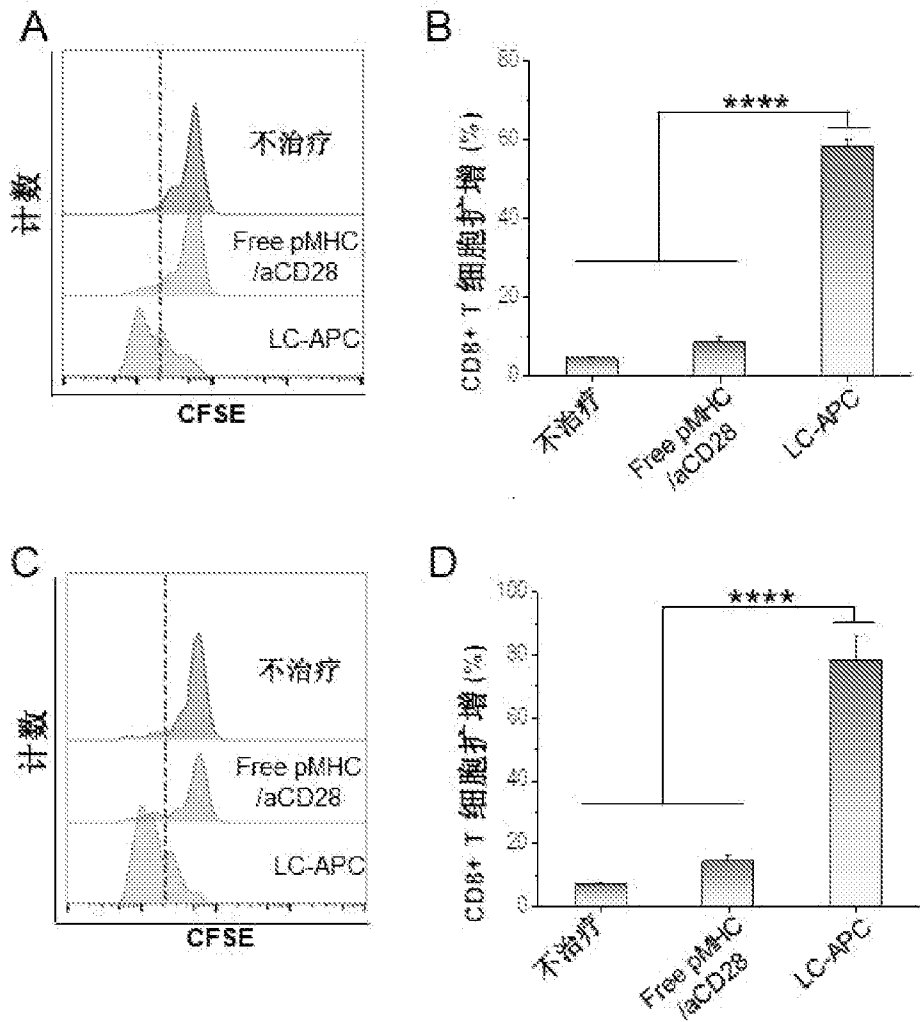


图 5

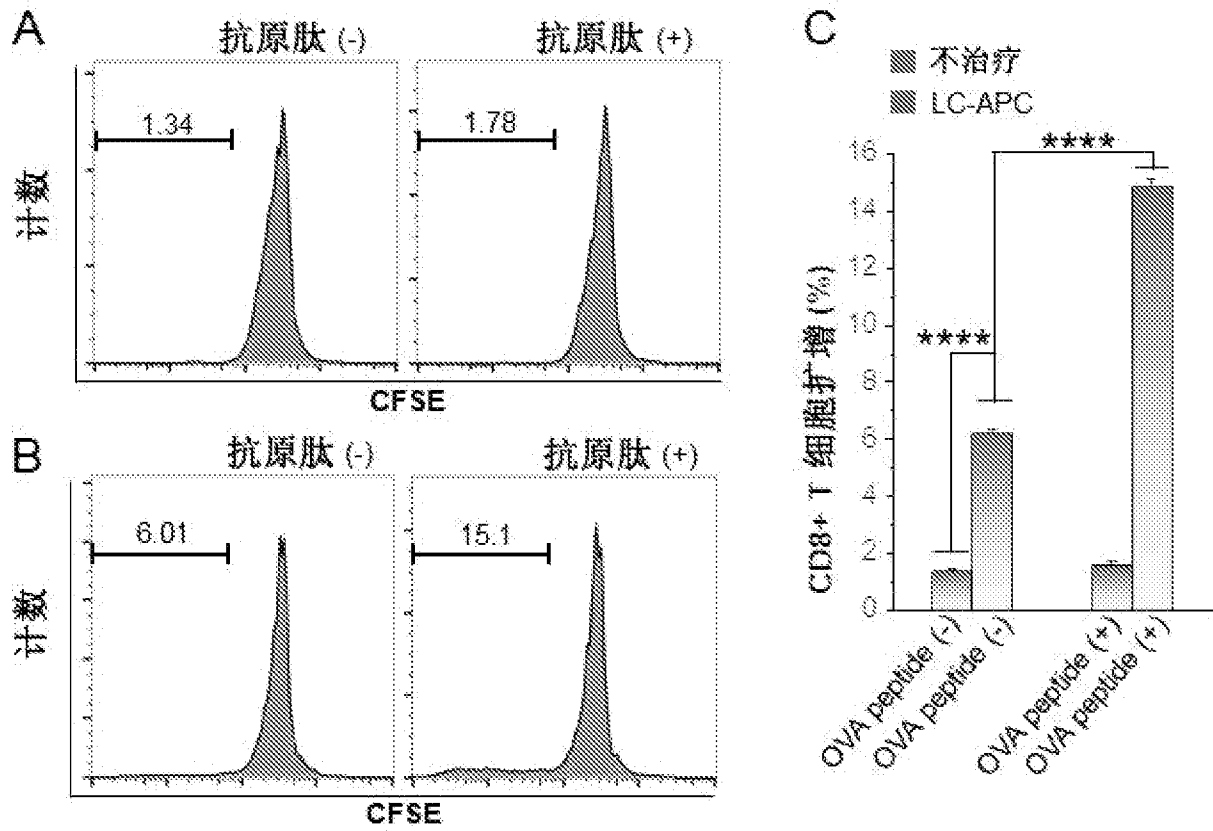


图 6

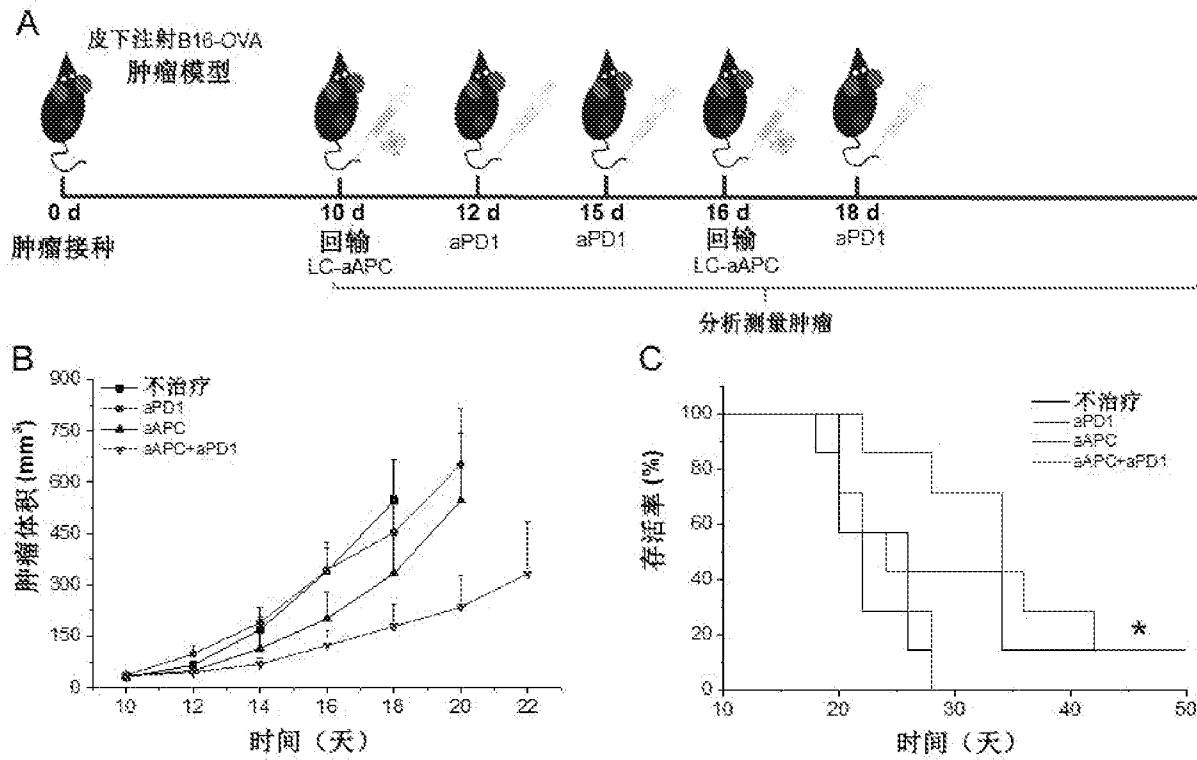


图 7

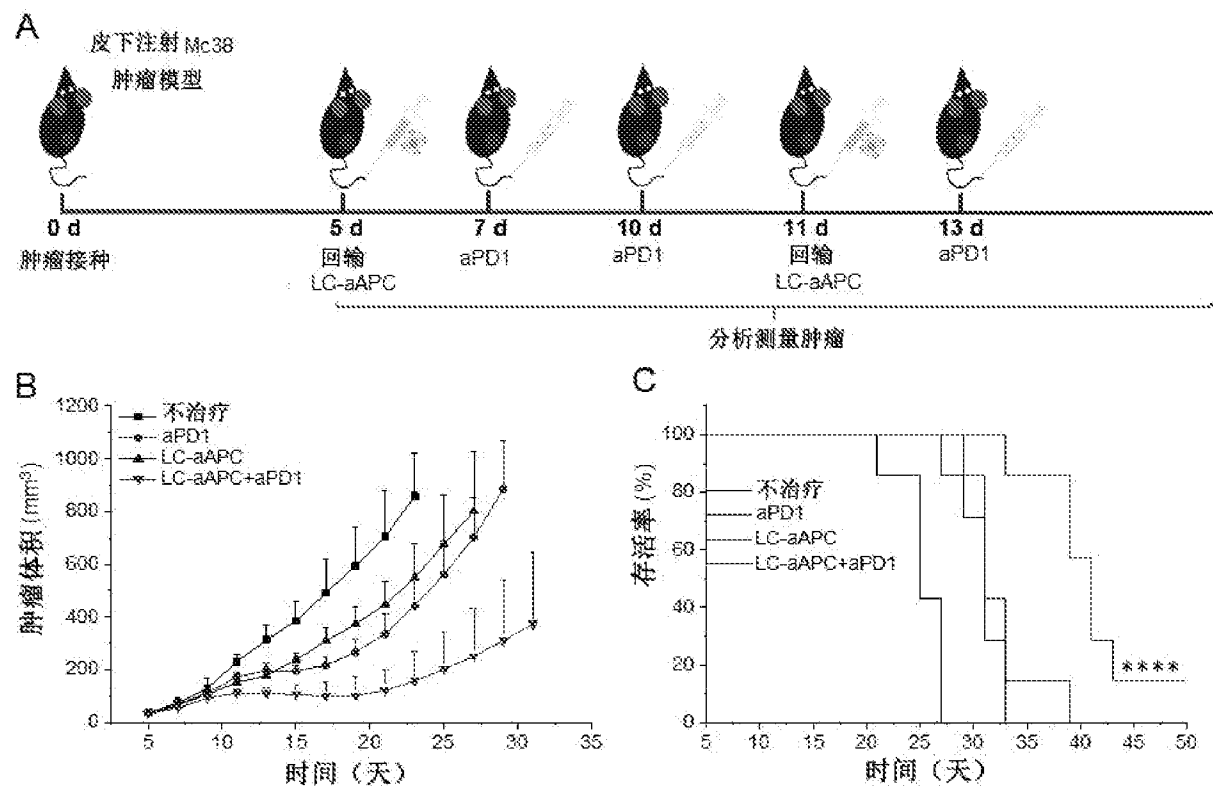


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/141285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0781(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, PubMed, 百度学术, BAIDU SCHOLAR; 人工抗原递呈细胞, 人工抗原提呈细胞, 人工抗原递呈细胞, 淋巴细胞, 靶向, 载体, 双链, artificial antigen-presenting cell, aAPC, lymphocyte, targeting, carrier, double stranded

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113528436 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 October 2021 (2021-10-22) see entire document	1-10
A	CN 110312790 A (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC.) 08 October 2019 (2019-10-08) see entire document	1-10
A	WO 2018053463 A1 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC. et al.) 22 March 2018 (2018-03-22) see entire document	1-10
A	周昌华 等 (ZHOU, Changhua et al.). "人工抗原提呈细胞研究进展 (Non-official translation: Research Progress on Artificial Antigen Presenting Cells)" <i>国外医学.输血及血液学分册 (Foreign Medical Sciences Blood Transfusion and Hematology)</i> , Vol. 27, No. 6, 31 December 2004 (2004-12-31), ISSN: 1673-419X, see section 4	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2022

Date of mailing of the international search report

07 May 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/141285

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王丽珩 等 (WANG, Liheng et al.). "人工抗原提呈细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展 (Non-official translation: Research progress of artificial antigen-presenting cells for tumor immunotherapy)" <i>国际生物制品学杂志 (International Journal of Biologicals)</i> , Vol. 29, No. 5, 31 October 2006 (2006-10-31), ISSN: 1673-4211, see section 2.2	1-10
A	KARLO, P. et al. "Linking form to function: Biophysical aspects of artificial antigen presenting cell design" <i>BIOCHIM BIOPHYS ACTA</i> , Vol. 1853, No. 4, 06 September 2014 (2014-09-06), ISSN: 1878-2434, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/141285

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/141285

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113528436	A	22 October 2021	None			
CN	110312790	A	08 October 2019	BR	112019008560	A2	17 September 2019
				MX	2019004708	A	29 August 2019
				US	2018127715	A1	10 May 2018
				AU	2017347942	A1	30 May 2019
				US	2019345445	A1	14 November 2019
				WO	2018081789	A1	03 May 2018
				EP	3532608	A1	04 September 2019
				JP	2019531744	A	07 November 2019
				IL	266221	D0	30 June 2019
				SG	11201903825 S	A	30 May 2019
				TW	201831690	A	01 September 2018
				MA	46668	A	04 September 2019
				CA	3041673	A1	03 May 2018
				KR	20190071802	A	24 June 2019
WO	2018053463	A1	22 March 2018	US	2019211075	A1	11 July 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/141285

A. 主题的分类

C12N 5/0781(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, PubMed, 百度学术; 关键词: 人工抗原呈递细胞, 人工抗原提呈细胞, 人工抗原递呈细胞, 淋巴细胞, 靶向, 载体, 双链, artificial antigen-presenting cell, aAPC, lymphocyte, targeting, carrier, double stranded

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113528436 A (苏州大学) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 参见全文	1-10
A	CN 110312790 A (艾欧凡斯生物治疗公司) 2019年10月8日 (2019 - 10 - 08) 参见全文	1-10
A	WO 2018053463 A1 (MOFF MOFFITT CANCER CENT & RES INST INC H LEE等) 2018年3月22日 (2018 - 03 - 22) 参见全文	1-10
A	周昌华 等. “人工抗原提呈细胞研究进展” 国外医学. 输血及血液学分册, 第27卷, 第6期, 2004年12月31日 (2004 - 12 - 31), ISSN: 1673-419X, 参见第4节	1-10
A	王丽珩 等. “人工抗原提呈细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展” 国际生物制品学杂志, 第29卷, 第5期, 2006年10月31日 (2006 - 10 - 31), ISSN: 1673-4211, 参见第2.2节	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年4月24日

国际检索报告邮寄日期

2022年5月7日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

罗霄

电话号码 62089158

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Karlo Perica 等. "Linking form to function: Biophysical aspects of artificial antigen presenting cell design" Biochim Biophys Acta, 第1853卷, 第4期, 2014年9月6日 (2014 - 09 - 06), ISSN: 1878-2434, 参见全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/141285

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113528436	A	2021年10月22日	无			
CN	110312790	A	2019年10月8日	BR	112019008560	A2	2019年9月17日
				MX	2019004708	A	2019年8月29日
				US	2018127715	A1	2018年5月10日
				AU	2017347942	A1	2019年5月30日
				US	2019345445	A1	2019年11月14日
				WO	2018081789	A1	2018年5月3日
				EP	3532608	A1	2019年9月4日
				JP	2019531744	A	2019年11月7日
				IL	266221	D0	2019年6月30日
				SG	11201903825S	A	2019年5月30日
				TW	201831690	A	2018年9月1日
				MA	46668	A	2019年9月4日
				CA	3041673	A1	2018年5月3日
				KR	20190071802	A	2019年6月24日
WO	2018053463	A1	2018年3月22日	US	2019211075	A1	2019年7月11日